

# APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PM 258100  
(M#)

Invention: NEUE FUR DAS TAL-GEN CODIERENDE NUKLEOTIDSEQUENZEN

Inventor (s): L. K. DUNICAN (Deceased)  
Ashling MCCORMACK  
Cliona STAPELTON  
Kevin BURKE  
Bettina MÖCKEL

Pillsbury Madison & Sutro LLP  
Intellectual Property Group  
1100 New York Avenue, NW  
Ninth Floor  
Washington, DC 20005-3918  
Attorneys  
Telephone: (202) 861-3000

This is a:

- ☐ Provisional Application
  - ☒ Regular Utility Application
  - ☐ Continuing Application
  - ☐ PCT National Phase Application
  - ☐ Design Application
  - ☐ Reissue Application
  - ☐ Plant Application
  - ☐ Substitute Specification
- Sub. Spec Filed \_\_\_\_\_  
in App. No. / \_\_\_\_\_

## SPECIFICATION

## Neue für das tal-Gen codierende Nukleotidsequenzen

1. *Background of the Invention*

a 7 Gegenstand der Erfindung sind für das tal-Gen kodierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das tal-Gen verstärkt wird.

2. *Background Information*

Stand der Technik

10 Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, insbesondere aber in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z. B. L-Lysin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung Aminosäure

produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei

- 5 Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: Biology of Industrial Microorganisms, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (Critical Reviews in  
10 Biotechnology 15, 73-103 (1995)) und Sahm et al. (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)).

- Die Bedeutung des Pentosephosphat-Zyklus' für die Biosynthese und Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch coryneforme Bakterien ist Gegenstand  
15 zahlreicher Bemühungen der Fachwelt.

- So berichten Oishi und Aida (Agricultural and Biological Chemistry 29, 83-89 (1965)) über den „hexosemonophosphate shunt“ von Brevibacterium ammoniagenes. Sugimoto und Shio  
a (Agricultural and <sup>Biological</sup> Biological Chemistry 51, 101-108 (1987))  
20 berichten über die Regulation der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase in Brevibacterium flavum.

*Summary of the Invention*  
~~Aufgabe der Erfindung~~

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie und insbesondere in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Base, sondern auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 5 (i) eine Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- 10 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

- 15 ein Polynukleotid gemäß Anspruch 4, enthaltend eine der Nukleotidsequenzen wie in SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 dargestellt,
- ein Polynukleotid gemäß Anspruch 5, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 dargestellt, enthält
- 20 ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

- Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die
- 25 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 3 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID NO. 1 oder

SEQ ID NO. 3 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für die Transaldolase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Transaldolase-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin  
10 geeignet als Primer zur Herstellung von DNA von Genen, die  
für die Transaldolase codieren, durch die Polymerase-  
Kettenreaktion (PCR).

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

20 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf  
Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es  
sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte  
RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine,  
25 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene  
Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 ein, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Transaldolase und auch solche, die zu wenigstens 70 % identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90 % bis

95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits eine Aminosäure produzieren, und in denen die für das tal-Gen codierenden Nukleotidsequenzen, verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- 10 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken
- 15 Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art
- 20 Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum, sind die zum Beispiel
- 30 bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

990228 BT

- 5 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539  
Corynebacterium melassecola ATCC17965  
Brevibacterium flavum ATCC14067  
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und  
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

- 10 Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709  
Brevibacterium flavum FERM-P 1708  
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712  
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463  
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und  
Corynebacterium glutamicum DSM5715  
Corynebacterium glutamicum DM58-1  
15 Corynebacterium glutamicum DSM12866.

und daraus hergestellte L-Threonin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

- 20 Corynebacterium glutamicum ATCC21649  
Brevibacterium flavum BB69  
Brevibacterium flavum DSM5399  
Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269  
Brevibacterium lactofermentum TBB-10

und daraus hergestellte L-Isoleucin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

- 25 Corynebacterium glutamicum ATCC 14309  
Corynebacterium glutamicum ATCC 14310  
Corynebacterium glutamicum ATCC 14311  
Corynebacterium glutamicum ATCC 15168  
Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6871

- 30 und daraus hergestellte L-Tryptophan produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

990228 BT



Corynebacterium glutamicum ATCC21850 und  
Corynebacterium glutamicum KY9218 (pKW9901)

Den Erfindern gelang es, das neue, für die Transaldolase  
(EC 2.2.1.2) kodierende tal-Gen von C. glutamicum zu  
5 isolieren.

Zur Isolierung des tal-Gens oder auch anderer Gene von C.  
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses  
Mikroorganismus in E. coli angelegt. Das Anlegen von  
Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und  
10 Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das...  
Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in  
die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland,  
1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular  
Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory  
15 Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die  
des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell  
50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et  
al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996)  
beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die  
20 mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987,  
Proceedings of the National Academy of Sciences USA,  
84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,  
1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.  
Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326  
25 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum  
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und  
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (The Cloning  
and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid  
Biosynthetic Genes from Corynebacterium glutamicum. Ph.D.  
30 Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997)  
beschreibt die Klonierung von C. glutamicum Genen unter  
Verwendung des von Short et al. (Nucleic Acids Research,  
16: 7583) beschriebenen  $\lambda$  Zap Expressionssysteme. Zur  
Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli  
35 können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,

25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc $r$ , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) dem FASTA-Algorithmus von Pearson und Lipman (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85,2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich zugänglichen Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Gegenstand der Erfindung ist die neue DNA-Sequenz aus C.glutamicum, die den für das tal-Gen kodierenden DNA-Abschnitt enthält, dargestellt als SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 3. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet.

In SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des Tal-Genproduktes dargestellt.

Eine auf die oben beschriebene Art und Weise hergestellte Genbank kann weiterhin durch Hybridisierung mit

5 Nukleotidsonden bekannter Sequenz wie beispielsweise des zwf-Gens (JP-A-09224661) untersucht werden. Die klonierte DNA der Klone, die eine positive Reaktion bei der Hybridisierung zeigen, wird wiederum sequenziert und man erhält zum einen die bekannte Nukleotidsequenz der

10 eingesetzten Sonde und zum anderen die benachbart liegenden neuen DNA-Sequenzen.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 3 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind

15 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 3 oder Teilen von oder SEQ ID NO 3 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z. B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in

20 Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen

25 oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology

30 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit oder SEQ ID

35 NO 3 oder Teilen von oder SEQ ID NO 3 hybridisieren,

5 Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge  
von mindestens 15 Nukleotiden.

10 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
(Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.  
(International Journal of Systematic Bacteriology (1991)  
41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-  
Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  
15 findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait:  
Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press,  
Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum  
Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

20 Überexpression des tal-Gens in verbesserter Weise  
Aminosäuren produzieren.

25 Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des  
Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise  
wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des  
Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare  
Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im  
30 Verlaufe der fermentativen L-Aminosäure-Produktion zu  
steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer  
der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.  
Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des  
Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die  
35 Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit

unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Beispielhaft wurde das erfindungsgemäße tal-Gen mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert.

Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Ein Beispiel für einen Plasmidvektor mit dessen Hilfe das Verfahren Amplifikation durch Integration durchgeführt werden kann ist pSUZ1, der in Figur 1 dargestellt ist. Plasmid pSUZ1 besteht aus dem von Spratt et al. (Gene 41:

337-342(1986))beschriebenem E. coli Vektor pBGS8 in den das tal-Gen eingebaut wurde.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben dem tal-Gen eines oder mehrere

- 5 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphatweges oder des Aminosäure-Exports zu verstärken oder zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung L-Aminosäuren, insbesondere von L-Lysin, gleichzeitig eines oder mehrere  
10 der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen (EP-B 0 197 335),
- das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende lysC-Gen (Kalinowski et al. (1990), Molecular  
15 and General Genetics 224: 317-324),
- das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (DE-A-  
20 198 31 609),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für die Transketolase kodierende tkt-Gen (Accession  
25 number AB023377 der Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland)),
- das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen (JP-A-9-224662),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende  
30 zwf-Gen (JP-A-9-224661),

- das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222),
- das zwal-Gen (DE 199 59 328.0; DSM 13115),
- das für die Enolase kodierende eno-Gen (DE: 19947791.4),
- 5 • das devB-Gen,
- das opcA-Gen (DSM 13264)

verstärkt, bevorzugt überexprimiert werden.

10 So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Threonin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom-Gen (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)) oder das für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende 15 hom<sup>dr</sup>-Allel (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)),
- das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 20 • das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mgo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 25 • das für die Transketolase kodierende tkt-Gen (Accession number AB023377 der Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland)),



- das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen (JP-A-9-224662),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende zwf-Gen (JP-A-9-224661),
- 5 ◦ das für den Threonin-Export kodierende thrE-Gen (DE 199 41 478.5; DSM 12840),
- das zwal-Gen (DE 199 59 328.0; DSM 13115),
- das für die Enolase kodierende eno-Gen (DE: 19947791.4),
- das devB-Gen,
- 10 ◦ das opcA-Gen (DSM 13264)

verstärkt, bevorzugt überexprimiert werden..

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des tal-Gens gleichzeitig

- 15 ◦ das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende pck-Gen (DE 199 50 409.1 DSM 13047) und/oder
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen (US 09/396,478, DSM 12969), oder
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen
- 20 (DE 199 51 975.7; DSM 13114), oder
- das zwa2-Gen (DE: 199 59 327.2; DSM 13113)

abzuschwächen.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des tal-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:
- 25 "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in:

Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder

00228 990228 BT

die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle  
5 Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise  
10 während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur  
15 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen  
20 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-  
25 Aminosäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et  
30 al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- *Escherichia coli* JM109/pSUZ1 als DSM 13263.

In SEQ ID NO 1 ist ebenfalls das neue devB-Gen enthalten. Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pSUZ1

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

- |    |          |   |
|----|----------|---|
| 5  | lacZ:    | segments of lacZ $\alpha$ gene fragment |
|    | kan r:   | kanamycin resistance                    |
|    | tal:     | transaldolase gene                      |
|    | ori:     | origin of replication of plasmid pBGS8  |
|    | BclI:    | cut site of restriction enzyme BclI     |
| 10 | EcoRI:   | cut site of restriction enzyme EcoRI    |
|    | HindIII: | cut site of restriction enzyme HindIII  |
|    | PstI:    | cut site of restriction enzyme PstI     |
|    | SacI:    | cut site of restriction enzyme SacI     |

000228 BT 990228 BT

## Examples

The following examples will further illustrate this invention. The molecular biology techniques, e.g. plasmid DNA isolation, restriction enzyme treatment, ligations, standard transformations of *Escherichia coli* etc. used are, (unless stated otherwise), described by Sambrook et al., (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratories, USA).

## 10 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der

Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 270870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

## Beispiel 2

## Isolierung und Sequenzierung des tal-Gens

20 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep  
Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,  
Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem  
Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-  
25 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit  
shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular  
Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung  
SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach  
gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung  
30 der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp  
mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021,  
Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors  
pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen,  
Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning





Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 3 dargestellt.

### Example 3

#### 10 Cloning of the tal gene

PCR was used to amplify DNA fragments containing the entire tal gene of *C. glutamicum* 13032 and flanking upstream and downstream regions. PCR reactions were carried out using oligonucleotide primers designed from the sequence as determined in examples 1 and 2. Genomic DNA was isolated from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 according to Heery and Dunican (Applied and Environmental Microbiology 59: 791-799 (1993)) and used as template. The tal primers used were:

20 fwd. primer: 5' GGT ACA AAG GGT CTT AAG 3'C  
rev. primer: 5' GAT TTC ATG TCG CCG TTA 3'

PCR Parameters were as follows:

35 cycles  
95°C for 3 minutes  
25 94°C for 1 minute  
47°C for 1 minute  
72°C for 45 seconds  
2.0 mM MgCl<sub>2</sub>  
approximately 150-200 ng DNA template.

30 The PCR product obtained was cloned into the commercially available pGEM-T vector purchased from Promega Corp. (pGEM-

15

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> National University of Ireland, Galway  
Degussa-Hüls AG

5

<120> Neue für das tal Gen codierende Nukleotidsequenzen

<130> 990228BT

10

<140>

<141>

<160> 4

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6995

<212> DNA

20

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (2471)..(3550)

25

<223> tal-Gen

<400> 1

cacatttgaa ccacagttgg ttataaaatg ggttcaacat cactatgggt agaggtgttg 60

30

acgggtcaga ttaagcaaag actactttcg gggtagatca cctttgccaa atttgaacca 120

attaacctaa gtcgtagatc tgatcatcgg atctaacgaa aacgaaccaa aactttgggtc 180

35

cgggtttaac ccaggaagga ttgaccacct tgacgctgtc acctgaactt caggcgctca 240

ctgtacgcaa ttaccctctc gattgggtcg atgtggacac caaggctgta gacactgttc 300

40

gtgtcctcgc tgcagacgct gtagaaaact gtgggtccgg ccaccaggc accgcaatga 360

gcctggctcc ccttgcatat acctgtgacc agcgggttat gaacgtagat ccacaggaca 420

ccaactgggc aggccgtgac cgcttcgttc tttcttgttg ccaactcctc ttgaccagc 480

45

acatccagct ttacttgggt ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca 540

cctgggattc cttgaccca ggacacctg agtaccgcca caccaagggc gttgagatca 600

ccactggccc tcttgccag ggtcttgcat ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc 660

50

gtgagcgtgg cctattcgac ccaaccgtg ctgagggcga atccccattc gaccaccaca 720

tctacgtcat tgcttctgat ggtgacctgc aggaagggtg cacctctgag gcactctcca 780

55

tcgctggcac ccagcagctg ggcaacctca tcgtgttctg ggatgacaac cgcactctca 840

tcgaagacaa cactgagatc gctttcaacg aggacgttgt tgctcgttac aaggcttacg 900

gctggcagac cattgaggtt gaggtggcg aggacgttgc agcaatcgaa gctgcagtgg 960

990228 BT

Suk  
BI

	ctgaggctaa	gaaggacacc	aagcgaccta	ccttcacccg	cggttcgcacc	atcatcggct	1020
	tcccagctcc	aactatgatg	aacaccgggtg	ctgtgcacgg	tgctgctctt	ggcgcagctg	1080
5	aggttgcagc	aaccaagact	gagcttggat	tcgatcctga	ggctcacttc	gcgatcgacg	1140
	atgaggttat	cgctcacacc	cgctccctcg	cagagcgcgc	tgcacagaag	aaggctgcat	1200
10	ggcaggtcaa	gttcgatgag	tgggcagctg	ccaaccctga	gaacaaggct	ctgttcgatc	1260
	gcctgaactc	ccgtgagctt	ccagcgggct	acgctgacga	gctcccaaca	tgggatgcag	1320
	atgagaaggg	cgtcgcaact	cgtaaggctt	ccgagggtgc	acttcaggca	ctgggcaaga	1380
15	cccttcctga	gctgtggggc	ggttcgctg	acctcgcagg	ttccaacaac	accgtgatca	1440
	agggctcccc	ttccttcggc	cctgagtcca	tctccaccga	gacctggtct	gctgagcctt	1500
20	acggccgtaa	cctgcacttc	ggtatccgtg	agcacgctat	gggatccatc	ctcaacggca	1560
	tttccctcca	cggtggcacc	cgcccatacg	gcggaacctt	cctcatcttc	tccgactaca	1620
	tgcgtcctgc	agttcgtctt	gcagctctca	tggagaccga	cgcttactac	gtctggaccc	1680
25	acgactccat	cggtctgggc	gaagatggcc	caaccaccca	gcctgttgaa	accttggctg	1740
	cactgcgcgc	catcccaggt	ctgtccgtcc	tgcgtcctgc	agatgcgaac	gagaccgccc	1800
30	aggcttgggc	tgcagcactt	gagtacaagg	aaggccctaa	gggtcttgca	ctgacccgcc	1860
	agaacgttcc	tgttctggaa	ggcaccaagg	agaaggctgc	tgaaggcggt	cgccgcgggtg	1920
	gctacgtcct	ggttgagggg	tccaaggaaa	ccccagatgt	gacccctcatg	ggctccggct	1980
35	ccgaggttca	gcttgcagtt	aacgctgcga	aggctctgga	agctgagggc	gttgcagctc	2040
	gcgttgtttc	cgttccttgc	atggattggg	tccaggagca	ggacgcagag	tacatcgagt	2100
40	ccgttctgcc	tgcagctgtg	accgctcgtg	tgtctgttga	agctggcatc	gcaatgcctt	2160
	ggtaccgctt	cttgggcacc	cagggccgtg	ctgtctccct	tgagcacttc	ggtgcttctg	2220
	cggattacca	gaccctgttt	gagaagttcg	gcacaccac	cgatgcagtc	gtggcagcgg	2280
45	ccaaggactc	cattaacggg	taattgccct	gctgttttta	gcttcaaccc	ggggcaatat	2340
	gattctccgg	aattttattg	ccccggggtg	ttgttggtta	tcggtacaaa	gggtcttaag	2400
50	cacatccctt	acttgctgc	tctccttgag	cacagttcaa	gaacaattct	tttaaggaaa	2460
	athtagtttc	atg tct cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc					2509
		Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser					
		1 5 10					
55	act tgg ctc gac gac ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc						2557
	Thr Trp Leu Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu						
	15 20 25						

[illegible]

gcg tac gct gca act ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc 3325  
 Ala Tyr Ala Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr  
 270 275 280 285  
 5 gtc aac acc atg cca gaa ggc acc atc gac gcg gtt ctg gag cag ggc 3373  
 Val Asn Thr Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly  
 290 295 300  
 10 aac ctg cac ggt gac acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct 3421  
 Asn Leu His Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala  
 305 310 315  
 15 gtg ttc tcc cag ctt gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc 3469  
 Val Phe Ser Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe  
 320 325 330  
 20 cag gtc ctg gag acc gag ggt gtg gac aag ttc gtt gct tct tgg agc 3517  
 Gln Val Leu Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser  
 335 340 345  
 gaa ctg ctt gag tcc atg gaa gct cgc ctg aag tagaatcagc acgctgcac 3570  
 Glu Leu Leu Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys  
 350 355 360  
 25 agtaacggcg acatgaaatc gaattagtgc gatcttatgt ggccggttaca catctttcat 3630  
 taaagaaagg atcgtgacac taccatcgtg agcacaaca cgacccctc cagctggaca 3690  
 30 aaccactgc gcgacccgca ggataaacga ctccccgca tcgctggccc ttccggcatg 3750  
 gtgatcttcg gtgtcactgg cgacttggct cgaaagaagc tgctccccgc catttatgat 3810  
 ctagcaaacg gcggattgct gccccagga ttctcgttgg taggttaacgg ccgccgcgaa 3870  
 35 tgggtccaaag aagactttga aaaatacgtc cgcgatgccg caagtgctgg tgctcgtacg 3930  
 gaattccgtg aaaatgtttg ggagcgctc gccgagggtg tggaatttgt tcgcggaac 3990  
 40 tttgatgatg atgcagcttt cgacaacctc gctgcaacac tcaagcgcac cgacaaaacc 4050  
 cgcggcaccg ccggcaactg ggcttactac ctgtccattc caccagattc cttcacagcg 4110  
 gtctgccacc agctggagcg ttccggcatg gctgaatcca ccgaagaagc atggcgccgc 4170  
 45 gtgatcatcg agaagccttt cggccacaac ctgcaatccg cacacgagct caaccagctg 4230  
 gtcaacgcag tcttcccaga atcttctgtg ttccgcacg accactatct gggcaaggaa 4290  
 50 acagttcaaa acatcctggc tctgcgtttt gctaaccagc tgtttgagcc actgtggaac 4350  
 tccaactacg ttgaccacgt ccagatcacc atggctgaag atattggctt ggggtggacgt 4410  
 gctggttact acgacggcat cggcgagcc cgcgacgtca tccagaacca cctgatccag 4470  
 55 ctcttggtc tggttgccat ggaagaacca atttcttctg tgccagcgca gctgcaggca 4530  
 gaaaagatca aggtgctctc tgcgacaaag ccgtgctacc cattggataa aacctccgct 4590

990228 BT  
 29

cgtggtcagt acgctgccgg ttggcagggc tctgagttag tcaagggact tcgcaagaa 4650  
 gatggcttca accctgagtc caccactgag acttttgccg cttgtacctt agagatcacg 4710  
 5 tctcgctcgt gggctgggtg gccgttctac ctgcgcaccg gtaagcgtct tggtcgccgt 4770  
 gttactgaga ttgccgtggt gtttaaagac gcaccacacc agcctttcga cggcgacatg 4830  
 10 actgtatccc ttggccaaaa cgccatcgtg attcgcgtgc agcctgatga aggtgtgctc 4890  
 atccgcttcg gttccaaggt tccaggttct gccatggaag tccgtgacgt caacatggac 4950  
 ttctctact cagaatcctt cactgaagaa tcacctgaag catacgagcg cctcattttg 5010  
 15 gatgcgctgt tagatgaatc cagcctcttc cctaccaacg aggaagtgga actgagctgg 5070  
 aagattctgg atccaattct tgaagcatgg gatgccgatg gagaaccaga ggattacca 5130  
 20 gcgggtacgt ggggtccaaa gagcgtgat gaaatgcttt cccgcaacgg tcacacctgg 5190  
 cgcaggccat aatttagggg caaaaaatga tctttgaact tccggatacc accaccacg 5250  
 aaatttccaa gaccctaact cgactgcgtg aatcgggcac ccaggtcacc accggccgag 5310  
 25 tgctcacct catcggtggtc actgactccg aaagcgatgt cgctgcagtt accgagtcca 5370  
 ccaatgaagc ctgcgcgag caccatctc gcgtgatcat tttggtggtt ggcgataaaa 5430  
 ctgcagaaaa caaagttgac gcagaagtcc gtatcggtgg cgacgctggt gcttccgaga 5490  
 30 tgatcatcat gcatctcaac ggacctgtcg ctgacaagct ccagtatgtc gtcacaccac 5550  
 tgttgcttcc tgacaccccc atcgttgctt ggtggccagg tgaatcacca aagaatcctt 5610  
 35 cccaggaccc aattggacgc atgcacaac gacgcatcac tgatgctttg tacgaccgtg 5670  
 atgacgcact agaagatcgt gttgagaact atcaccagg tgataccgac atgacgtggg 5730  
 cgcgccttac ccagtggcgg ggacttggtg cctcctcatt ggatcaccca ccacacagcg 5790  
 40 aatcacttc cgtgaggctg accggtgcaa gcggcagtac ctcggtggat ttggctgcag 5850  
 gctggttggc gcggaggctg aaagtgcctg tgatccgcga ggtgacagat gctcccaccg 5910  
 45 tgccaaccga tgagtttggg actccactgc tggctatcca gcgcctggag atcgttcgca 5970  
 ccaccggctc gatcatcatc accatctatg acgctcatal ccttcaggta gagatgccgg 6030  
 aatccggcaa tgccccatcg ctggtggcta ttggtcgctg aagtgagtc gactgcttgt 6090  
 50 ctgaggagct tcgccacatg gatccagatt tgggctacca gcacgacta tccggcttgt 6150  
 ccagcgtcaa gctggaaacc gtctaaggag aaatacaaca ctatggttga tgtagtacgc 6210  
 55 gcacgcgata ctgaagattt gggtgcacag gctgcctcca aattcattga gggtgttgaa 6270  
 gcagcaactg ccaataatgg caccgcacag gtagtgctca ccggtgggtg gcccgccatc 6330  
 aagttgctgg aaaagctcag cgttgatgcg gctgaccttg cctgggatcg cattcatgtg 6390

990228 BT  
 30

ttcttcggcg atgagcgcaa tgtccctgtc agtgattctg agtccaatga gggccaggct 6450  
5 cgtgaggcac tgttgtccaa ggtttctatc cctgaagcca acattcacgg atatgggtctc 6510  
ggcgacgtag atcttgacaga ggcagcccg cgttacgaag ctgtgttgga tgaattcgca 6570  
ccaaacggct ttgatcttca cctgctcggc atgggtggcg aaggccatat caactccctg 6630  
10 ttccctcaca ccgatgcagt caaggaatcc tccgcaaagg tcatcgcggt gtttgattcc 6690  
cctaagcctc cttcagagcg tgcaactcta acccttctctg cggttcactc cgcaaagcgc 6750  
15 gtgtgggttg tggtttctgg tgcggagaag gctgaggcag ctgcggcgat cgtcaacggg 6810  
gagcctgctg ttgagtggcc tgctgctgga gctaccggat ctgaggaaac ggtattgttc 6870  
ttggctgatg atgctgcagg aaatctctaa gcagcgccag ctctaacaag aagctttaac 6930  
20 aagaagctct aacgaaaagc actaacaaac taatccgggt gcgaaccttc atctgaatcg 6990  
atgga 6995

25 <210> 2  
<211> 360  
<212> PRT  
<213> *Corynebacterium glutamicum*

30 <400> 2  
Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu  
1 5 10 15  
35 Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val  
20 25 30  
Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe  
35 40 45  
40 Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu  
50 55 60  
Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser  
45 65 70 75 80  
50 Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu  
85 90 95  
Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg  
100 105 110  
Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp  
115 120 125  
55 Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro  
130 135 140  
Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val  
145 150 155 160



48

gac gac ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc agc cag gtt 96  
 Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val  
 20 25 30

5 att gag gaa aag tct gta gtc ggt gtc acc acc aac cca gct att ttc 144  
 Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe  
 35 40 45

10 gca gca gca atg tcc aag ggc gat tcc tac gac gct cag atc gca gag 192  
 Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu  
 50 55 60

15 ctc aag gcc gct ggc gca tct gtt gac cag gct gtt tac gcc atg agc 240  
 Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser  
 65 70 75 80

20 atc gac gac gtt cgc aat gct tgt gat ctg ttc acc ggc atc ttc gag 288  
 Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu  
 85 90 95

25 tcc tcc aac ggc tac gac ggc cgc gtg tcc atc gag gtt gac cca cgt 336  
 Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg  
 100 105 110

30 gca aag gtt gat cgt cca aac gtc atg atc aag atc cct gca acc cca 432  
 Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro  
 130 135 140

35 ggt tct ttg cca gca atc acc gac gct ttg gct gag ggc atc agc gtt 480  
 Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val  
 145 150 155 160

40 aac gtc acc ttg atc ttc tcc gtt gct cgc tac cgc gag gtc atc gct 528  
 Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala  
 165 170 175

45 gcg ttc atc gag ggc atc aag cag gct gct gca aac ggc cac gac gtc 576  
 Ala Phe Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly His Asp Val  
 180 185 190

50 tcc aag atc cac tct gtg gct tcc ttc ttc gtc tcc cgc gtc gac gtt 624  
 Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val  
 195 200 205

55 gag atc gac aag cgc ctc gag gca atc gga tcc gat gag gct ttg gct 672  
 Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala  
 210 215 220

ctg cgc ggc aag gca ggc gtt gcc aac gct cag cgc gct tac gct gtg 720  
 Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val  
 225 230 235 240

tac aag gag ctt ttc gac gcc gcc gag ctg cct gaa ggt gcc aac act 768  
 Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr  
 245 250 255

00000000000000000000

	cag	cgc	cca	ctg	tgg	gca	tcc	acc	ggc	gtg	aag	aac	cct	gcg	tac	gct	816
	Gln	Arg	Pro	Leu	Trp	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Asn	Pro	Ala	Tyr	Ala	
				260					265					270			
5	gca	act	ctt	tac	gtt	tcc	gag	ctg	gct	ggc	cca	aac	acc	gtc	aac	acc	864
	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	Ala	Gly	Pro	Asn	Thr	Val	Asn	Thr	
			275					280					285				
10	atg	cca	gaa	ggc	acc	atc	gac	gcg	gtt	ctg	gag	cag	ggc	aac	ctg	cac	912
	Met	Pro	Glu	Gly	Thr	Ile	Asp	Ala	Val	Leu	Glu	Gln	Gly	Asn	Leu	His	
		290					295					300					
15	ggc	gac	acc	ctg	tcc	aac	tcc	gcg	gca	gaa	gct	gac	gct	gtg	ttc	tcc	960
	Gly	Asp	Thr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Phe	Ser	
	305					310					315					320	
20	cag	ctt	gag	gct	ctg	ggc	gtt	gac	ttg	gca	gat	gtc	ttc	cag	gtc	ctg	1008
	Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Asp	Val	Phe	Gln	Val	Leu	
					325					330					335		
25	gag	acc	gag	ggc	gtg	gac	aag	ttc	gtt	gct	tct	tgg	agc	gaa	ctg	ctt	1056
	Glu	Thr	Glu	Gly	Val	Asp	Lys	Phe	Val	Ala	Ser	Trp	Ser	Glu	Leu	Leu	
				340					345					350			
30	gag	tcc	atg	gaa	gct	cgc	ctg	aag	tag								1083
	Glu	Ser	Met	Glu	Ala	Arg	Leu	Lys									
			355					360									
35	<210>	4															
	<211>	360															
	<212>	PRT															
	<213>	Corynebacterium glutamicum															
40	<400>	4															
	Met	Ser	His	Ile	Asp	Asp	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Thr	Ser	Thr	Trp	Leu	
	1				5					10					15		
45	Asp	Asp	Leu	Ser	Arg	Glu	Arg	Ile	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Val	
				20					25					30			
50	Ile	Glu	Glu	Lys	Ser	Val	Val	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Pro	Ala	Ile	Phe	
			35					40					45				
55	Ala	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Asp	Ser	Tyr	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	
		50					55					60					
60	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	Gln	Ala	Val	Tyr	Ala	Met	Ser	
	65					70					75					80	
65	Ile	Asp	Asp	Val	Arg	Asn	Ala	Cys	Asp	Leu	Phe	Thr	Gly	Ile	Phe	Glu	
					85				90						95		
70	Ser	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Val	Ser	Ile	Glu	Val	Asp	Pro	Arg	

25

30

35

40

*Handwritten signature*

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterienk,  
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus  
5 der Gruppe
- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
codiert, das die Aminosäuresequenzen von  
SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens  
70 % identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von  
SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,  
20 wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien  
replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist, die  
zusätzlich zumindest eine der Nukleotidsequenzen  
enthält, die für die Gene tkt, zwf, opcA und devB  
codieren.
- 25 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,  
wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,  
enthaltend eine der Nukleinsäuresequenz, wie in  
SEQ ID NO. 3 dargestellt.
- 30 5. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,  
das für ein Polypeptid codiert, das die

Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 dargestellt, enthält.

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend

(i) eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO. 3 dargestellt, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die den Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zur den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

7. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

8. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das tal-Gen und gegebenenfalls eines oder mehrere der Gene tkt-Gen, zwf-Gen, devB-Gen oder opcA-Gen gleichzeitig verstärkt,
- b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen die  
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet  
sind, die die Bildung des der gewünschten L-Aminosäure  
verringern.
11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8  
bis 12,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man coryneforme Bakterien verwendet, die eine der  
Aminosäuren aus der Gruppe L-Lysin, L-Threonin, D-  
Isoleucin oder L-Tryptophan herstellen.
12. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, gemäß Anspruch 8,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man in den coryneformen Mikroorganismen, die  
insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren,  
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe
- 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende dapA-Gen,
- 12.2 das für eine feed back resistente  
Aspartatkinase kodierende lysC-Gen,
- 12.3 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 12.4 das für die Pyruvat-Carboxylase  
kodierende pyc-Gen,
- 12.5 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase  
kodierende mgo-Gen,
- 12.6 das für die Transketolase kodierende tkt-Gen,

- 12.7 das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase  
kodierende gnd-Gen,
- 12.8 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase  
kodierende zwf-Gen,
- 5 12.9 das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen,
- 12.10 das zwal-Gen,
- 12.11 das für die Enolase kodierende eno-Gen,
- 12.12 das opcA-Gen
- verstärkt bzw. überexprimiert.
- 10 13. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin  
gemäß Anspruch 8,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man in coryneformen Mikroorganismen, die  
insbesondere bereits L-Threonin produzieren,  
15 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe
- 13.1 gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase  
kodierende hom-Gen oder das für eine "feed back  
resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende  
20 hom<sup>dr</sup>-Allel,
- 13.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 13.3 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende pyc-  
Gen,
- 25 13.4 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase  
kodierende mqo-Gen,
- 13.5 das für die Transketolase kodierende tkt-Gen,



- 13.6 das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase  
kodierende gnd-Gen,
- 13.7 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase  
kodierende zwf-Gen,
- 5 13.8 das für den Threonin-Export kodierende thrE-Gen,
- 13.9 das zwf-Gen,
- 13.10 das für die Enolase kodierende eno-Gen,
- 13.11 das opcA-Gen
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 10 14. Verfahren gemäß Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man für die Herstellung von L-Aminosäuren,  
insbesondere von L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin oder  
L-Tryptophan Bakterien fermentiert, in denen man
- 15 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe,
- 14.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
codierende pck-Gen
- 14.2 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase  
20 codierende pgi-Gen
- 14.3 das für die Pyruvat-Oxidase codierende poxB-Gen  
oder
- 14.4 das zwa2-Gen
- abschwächt.
- 25 15. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1  
als Hybridisierungssonden zur Isolation von cDNA, die  
für das tal-Genprodukt codiert.

16. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1 als Hybridisierungssonden zur Isolierung von cDNA oder Genen, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des tal-Gens aufweisen.

[illegible]

**Neue für das tal-Gen codierende Nukleotidsequenzen****Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterienk, enthaltend eine

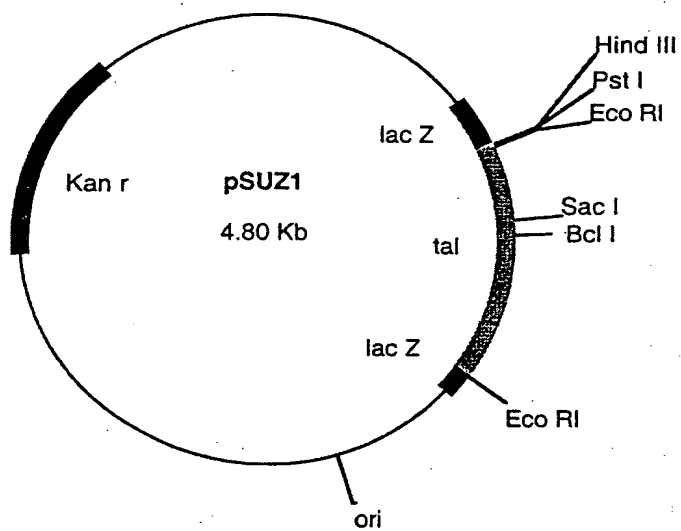
- 5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
  - 15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c)

und ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,

20 das dadurch gekennzeichnet ist, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das tal-Gen verstärkt,
- 25 b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

Figure 1:

WS  
3/5/03

00331260 032000